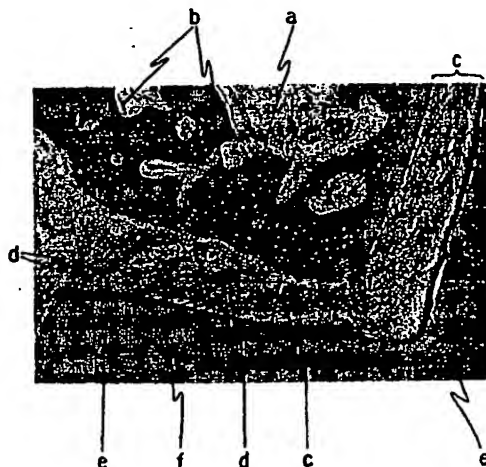


PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A61K 37/24	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/05840 (43) 国際公開日 1995年3月2日 (02.03.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01211 (22) 国際出願日 1993年8月25日(25. 08. 93) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科研製薬株式会社 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒113 東京都文京区本駒込二丁目28番8号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 浅野泰司 (ASANO, Taiji) [JP/JP] 寺嶋昭夫 (TERASHIMA, Akio) [JP/JP] 天川昌洋 (AMAKAWA, Masahiro) [JP/JP] 嵯峨克昌 (SAGA, Katsumasa) [JP/JP] 〒607 京都府京都市山科区四ノ宮南河原町14番地 科研製薬株式会社 中央研究所内 Kyoto, (JP) 杉本 肇 (SUGIMOTO, Hajime) [JP/JP] 中野好子 (NAKANO, Yoshiko) [JP/JP] 〒426 静岡県藤枝市源助301番地 科研製薬株式会社 中央研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 朝日奈宗太, 外 (ASAHI, Sohta et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区谷町二丁目2番22号 NSビル Osaka, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : PERIODONTAL DISEASE REMEDY**(54) 発明の名称** 歯周組織疾患治療剤**(57) Abstract**

A periodontal disease remedy containing a basic fibroblast growth factor as the active ingredient, a method of treating periodontal diseases by using the same, and an implant fixation promoter and a dentin regenerating agent each containing the same. The remedy is excellent in the safety and effectiveness in healing the missed and/or damaged periodontium ultimately by regeneration or attachment of new material.

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

塩基性線維芽細胞成長因子を有効成分として含有する
歯周組織疾患治療剤、それを用いる歯周組織疾患の治療
方法、インプラント材定着促進剤ならびに象牙質再生治
療剤に関する。

本発明によれば、喪失および／または損傷を受けた歯
周組織を治療の最終目標である再生治癒または新付着治
癒に導くための安全性、有効性にすぐれた歯周組織疾患
治療剤が提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	スリベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

(1)

明 細 書

歯周組織疾患治療剤

技術分野

本発明は、塩基性線維芽細胞成長因子を有効成分として含有する歯周組織疾患治療剤ならびにそれを用いる歯周組織疾患の治療方法に関する。さらに詳しくは、歯根膜、歯槽骨およびセメント質などの歯周組織におこる疾患を、治療の最終目標である再生治癒または新付着治癒に導くことを目的として用いる薬剤およびそれを用いる治療方法に関する。

背景技術

歯周組織疾患のうち、歯周炎はおもに歯根面に集落を形成する細菌によって引き起こされることが明確にされつつある現在、その治療としては、主としてスクレーピングにより機械的に歯面に付着したプラークを除去し、プラークフリーの状態に保つことに重点がおかれている。

また、重篤な歯周炎に対して行なわれる歯周外科療法は、同様に歯周ポケット内の歯根面に付着したプラークおよび歯石などの原因因子ならびに病的組織を除去することにより、口腔清掃をより効果的にする環境に改善することを目的に行なわれている。さらに、最近ではこれらの療法に加えて抗生物質による化学療法も試みられている。

しかし、これらの療法は病巣をなくし歯周炎の進行を阻止するが、破壊された歯周組織を積極的に修復または

(2)

再生させるものではなく、術後の治癒形態は自己の治癒能力に依存するものである。

5 治癒形態としては、再生 (regeneration) 治癒または新付着 (new attachment) 治癒と再付着 (reattachment) 治癒に分けられる。再生治癒とは、術後に露出した歯根面にコラーゲン繊維の埋入したセメント質形成 (新付着治癒) が起きるとともに、歯槽骨の再生をともなう治癒形態である。

10 一方、再付着とは、歯根面に認められる長い上皮性付着あるいは機能的回復の望めないコラーゲン線維束の歯根面への集積像を示す治癒形態である。

従来より多数の基礎的、臨床的研究がなされてきたが、術後の治癒形態の多くは再付着治癒であり、病理組織学的研究では再付着の多くが歯齦縁から根端側方向への上皮性細胞の侵入 (down growth) による上皮性付着によるものであり、新付着の起こりにくいことが示されている。

とくに進行した歯周炎では、複雑なポケット形成とさまざまなタイプの骨破壊をともなっており、高度の骨吸収がみられるばあいの骨再生は不可能である。また、メルヒャー (Melcher) (メルヒャー エー エイチ: ジャーナル オブ ペリオドントロジー (Melcher, A. H.: J. Periodontol.))、47 巻、256 ~ 260 頁、1976) は、露出した歯根面への新付着をともなう歯周組織の回復のためには歯根膜由来細胞の増殖が必要であり、25 歯根面へ到達する細胞が上皮細胞、歯肉由来細胞または骨由来細胞であるばあいには、長い接合上皮形成、歯根吸収や膠着 (ankylosis) が起こると報告している。

これらのことから、再生治癒をうることを目的として、

(3)

- (1) クエン酸による歯根表面の処理、
(2) フィブロネクチンの局所投与、
(3) 生体適合性の高いフィルターを用いて上皮性細胞の侵入を阻止し、歯根膜細胞を歯根表面に誘導
5 する「組織再生誘導法 (GTR 法)」、
(4) 歯槽骨の吸収に対する、種々の移植材料を用いる骨欠損部位への移植および
(5) 骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein) の局所投与
10 などが基礎もしくは臨床で研究されている。

しかし、(1) は細胞に対する為害性、(2) は高分子であるフィブロネクチンの安定性および抗原性、(3) は前記フィルターの摘出のための再手術の必要性、また、
(4) は移植材料の採取、保存、滅菌の繁雑さおよび吸
15 収性、(5) は膠着が生じやすいなどの種々の問題点を有しており、安全性、剤型化の容易性および有効性を兼ね備えた歯周組織再生を促進する薬剤の開発が望まれている。

本発明は、前記安全性および有効性にすぐれた歯周組織疾患治療剤、それを用いる歯周組織疾患の治療方法、
20 インプラント材定着促進剤ならびに象牙質再生治療剤を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明は、塩基性線維芽細胞成長因子を有効成分として含有してなる歯周組織疾患治療剤に関する。
25

前記課題に鑑みて、本発明者らは、塩基性線維芽細胞成長因子を用いたばあいに歯周組織疾患治療剤として有

(4)

効性、安全性にすぐれることを見い出した。

本発明に用いられる塩基性線維芽細胞成長因子（以下、「bFGF」という）は、脳下垂体、脳、網膜、黄体、副腎、腎、胎盤、前立腺、胸腺などの臓器より抽出されるもの、組換えDNA技術などの遺伝子工学的手法で製造されるもの、または臓器より抽出されるbFGFや組換えDNA技術などの遺伝子工学的手法で製造されるbFGFのアミノ酸配列においてアミノ酸が付加された、アミノ酸の一部が他のアミノ酸で置換されたまたはアミノ酸の一部が欠損したムテイン体で、線維芽細胞成長因子として作用しうるものを含む。これらは単一またはそれらの混合物として用いてもよい。

前記bFGFとしては、好ましくはたとえばWO 87/01728（特表昭63-500843号公報）、WO 89/04832（特表平2-504468号公報）、WO 86/07595（特表昭63-500036号公報）、WO 87/03885（特表昭63-501953号公報）、欧州特許出願公開第237966号明細書（特開昭63-226287号公報）、欧州特許出願公開第281822号明細書（特開平2-193号公報）、欧州特許出願公開第326907号明細書（特開平2-209894号公報）、欧州特許出願公開第394951号明細書（特開平3-61494号公報）、欧州特許出願公開第493737号明細書（特開平5-124975号公報）などに記載のbFGFがあげられる。

これらのbFGFのうち、WO 87/01728に記載の遺伝子工学的手法で製造した配列番号1の154個のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号2

(5)

の 1 5 3 個のアミノ酸配列を有するポリペプチドが、安定性および材料として必要な量を常に供給することが容易であるという点からとくに好ましい。具体的には特表昭 6 3 - 5 0 0 8 4 3 号公報の実施例に記載されたように、ヒトの腎臓の m R N A から調製された λ g t 1 0 c D N A ライブラリーからウシの 1 . 4 k b 塩基性副断片を用いてヒトの塩基性 F G F の c D N A クローンを調製し、発現ベクターを構築して前記クローンを発現することによって、配列番号 1 の 1 5 4 個のアミノ酸配列を有するポリペプチドは遺伝子工学的手法を用いてえられる。

本明細書に記載される「歯周組織」とは、歯の周囲の組織であり、歯の支持装置であり、歯根膜、歯槽骨、セメント質、歯肉、口腔粘膜で構成されている組織を意味する。

「歯根膜」とは、歯を歯槽窩に連結している通常、厚さ約 2 0 0 ~ 2 5 0 μ m の結合組織であり、咬合力などが直接的に歯槽骨に及ばないように緩衝作用を果たしている。そのため歯根膜には、歯と歯槽骨を結ぶ線維群（シャープピー線維）とそのあいだにリンパ管、血管、神経が豊富に分布して、歯根膜の栄養と強い衝撃から歯と歯周組織を守っている。細胞成分としては、線維芽細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞などからなる。

「歯槽骨」とは、歯根膜を介して歯を支持している顎骨を意味する。歯槽骨は、リモデリングを繰り返しながら支持器官としての役割を果たしているが、歯周炎などの歯周組織疾患によりリモデリングのバランスがくずれると、骨芽細胞と破骨細胞の変化にともなって骨吸収が引き起こされる。

(6)

「セメント質」とは、歯根の周囲を覆う明黄色の骨様結合組織であり、歯根膜のシャーピー線維を包埋して歯槽骨と歯を結合させている組織を意味する。セメント質は歯根膜より栄養を受けていることから、歯根膜の消失にともなって壊死、感染ののち異物化する。

本発明の歯周組織疾患治療剤は、前記セメント質、歯根膜および歯槽骨などの歯周組織に対するすぐれた再生促進作用を有しており、歯周炎の進行により喪失または損傷を受けた前記歯周組織を治療の最終目標である再生治癒または新付着治癒に導くのみならず、関連する諸疾患、たとえば、抜歯後および嚢胞または口腔癌摘出後の歯周組織の修復、インプラント材の定着促進およびう蝕により欠損した象牙質の再生などにも有効であり、種々の歯周疾患治療に用いられる。

本発明の歯周組織疾患治療剤は、通常の製剤技術に従って前記 b F G F を薬理学的に許容される添加剤、たとえば溶剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、安定剤または歯科領域で使用される充填剤と組み合わせ、液剤、乳剤、ゲル化剤、粉剤、凍結乾燥製剤、マイクロカプセル剤またはマイクロスフェア剤などの剤形に調製することができる。

また、目的に応じて徐放剤を調製することもできる。

歯周組織疾患治療剤に b F G F を含有せしめる方法としては、たとえば混和、混捏、溶解、浸漬、浸透、散布、塗布、注入などの公知の方法が適宜選ばれる。溶剤とするばあい、b F G F の安定性を考慮して p H は 4.0 ~ 8.0、なかんづく 4.5 ~ 7.0 とすることが好ましい。製剤化に際して温度は 30℃ なかんづく 15℃ 以下

(7)

に制御することが好ましい。

前記剤形に調製したb F G Fを外用剤、注入剤、貼付剤、塗布剤、注射剤、埋込み剤などの形態として投与することができる。

- 5 前記製剤中におけるb F G Fの含有量は0.0001～20%が好ましく、有効成分以外の前記添加剤の使用量は80～99.9999%が好ましい。

投与するb F G Fは、0.1～1000 μ g、好ましくは1～500 μ gを含有するように調製するとよい。

- 10 本発明の歯周組織疾患治療剤は、歯周病患部ならびに抜歯や歯周外科処置または滑面滑沢処理後の歯根面、剝離歯肉面、歯槽骨面もしくはその近傍に投与することにより使用できる。

- 15 本発明の歯周組織疾患の治療法は、前記剤形に調製されたb F G Fをかかると患部など、またはその近傍に、投与部位の形態、症状および投与すべき量に応じた適用形態として投与することにより行なわれる。

- 20 本発明の歯周組織疾患の治療法において、前記治療剤の投与量は治療すべき症状、部位により適宜増減できるが、b F G Fの使用量としてヒトに1回0.1～1000 μ g、好ましくは1～500 μ gを1日1～3回患部またはその近傍に適用すると、歯槽骨、歯根膜、セメント質などの歯周組織の再生促進効果が発揮され、所望の歯周組織疾患の治療効果が発揮される。

25

図面の簡単な説明

第1図は、実施例1の歯周組織再生試験によってえられるイヌ人工歯周組織欠損術後の病理標本の光学顕微鏡

(8)

写真である。

第2図は、比較例1の歯周組織再生試験によってえられるイヌ人工歯周組織欠損術後の病理標本の光学顕微鏡写真である。

5 第3図は、実施例2の歯周組織再生試験によってえられるイヌ人工歯周組織欠損術後2週の病理標本の光学顕微鏡写真である。

第4図は比較例2の歯周組織再生試験によってえられるイヌ人工歯周組織欠損術後2週の病理標本の光学顕微鏡写真である。

第5図は実施例2の歯周組織再生試験によってえられるイヌ人工歯周組織欠損術後4週の病理標本の光学顕微鏡写真である。

第6図は比較例2の歯周組織再生試験によってえられるイヌ人工歯周組織欠損術後4週の病理標本の光学顕微鏡写真である。

第7図は実施例2の歯周組織再生試験によってえられるイヌ人工歯周組織欠損術後4週の病理標本の一部を拡大した光学顕微鏡写真である。

20 発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例および比較例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はもとよりかかる実施例にのみ限定されるものではない。

以下の試験に用いたb F G FはW O 8 7 / 0 1 7 2 8
25 に記載の遺伝子工学的手法で製造した配列番号1の15
4個のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

(9)

製剤例 1

配列番号 1 で示される b F G F 含有水剤の調製

配列番号 1 で示される b F G F 2. 7 7 5 m g に生理食塩水を加えて全量が 0. 5 5 5 m l となるように水
5 剤を調製した。

前記 b F G F 含有水剤を用い歯周組織再生促進作用を試験した。以下に、その試験方法およびその結果を示す。

実施例 1 および比較例 1

歯周組織欠損術後の再生に及ぼす b F G F の影響

10 ビーグル犬 (n = 3) を用い人工的歯周組織欠損術後の各歯周組織再生に対する配列番号 1 で示される b F G F 含有水剤の作用を、病理組織学的に検討した。

ビーグル犬の口腔内にブラッシングなどを行なって健全な歯周組織を維持した。常法により上顎左右前歯部位
15 の粘膜骨膜弁を剥離して骨を裸出し、歯根部に相当する頬側骨面より歯槽骨および歯根膜を貫き象牙質にまで到達する人工的歯周組織の欠損 (直径 3 m m、奥行き 2 m m) 形態を作製した。なお欠損部の窩底はチゼルなどを用いてセメント質を除去し、象牙質を裸出した。

20 その後、右側 (実施例 1) に 5 0 μ g の配列番号 1 で示される b F G F を含有する水剤 1 0 μ l を、左側 (比較例 1) に配列番号 1 で示される b F G F を含まない生理食塩水 1 0 μ l を注入投与し、粘膜骨膜弁をもとの位置に戻し縫合した。手術 1 週後に抜糸を行ない、4 週後に屠殺しアザン染色法により病理標本作製し、光学顕
25 微鏡にて観察した。

図 1 に実施例 1 の観察結果を、図 2 に比較例 1 の観察

(10)

結果を示す。いずれも10倍の倍率で観察した。

図1に示されるように実施例1においては、

- (1) 歯冠側(図1左側)および根尖側(図1右側)の
歯槽骨切断部より新生歯槽骨aが、欠損窩洞中央部
5 向かい増殖、侵入する像がみられた。骨梁辺縁には骨
芽細胞bが並び、また破骨細胞も認められ、骨の活発
なりモデリングの傾向がみられた。
- (2) 新生歯槽骨と歯根面との間に新生された歯根膜c
は、既存の歯根膜に比べてその幅は広く、毛細血管に
10 富んでおり、その線維(シャープ線維)dの走行は
歯根面に斜走あるいは垂直に配列しつつあり、新生セ
メント質eに埋入する像がみられた。
- (3) 新生セメント質eは、既存のセメント質表面から
裸出された歯根面上に形成され、歯根面象牙質の吸収
15 窩にも新生セメント質eがほぼ一様に形成されていた。
新生歯槽骨aと歯根面との間の新生歯根膜cは、既存
の歯根膜と類似する像を呈していた。

これに対し、図2に示されるように比較例1において
は、

- 20 (4) 実施例1と同様に、歯冠側(図2左側)および根
尖側(図2右側)の歯槽骨切断部より骨梁辺縁に骨芽
細胞bが並ぶ新生歯槽骨aが欠損窩洞中央部に向かい
増殖、侵入する像がみられたものの、実施例1に比べ
てその形成程度は低かった。
- 25 (5) 新生歯槽骨aと歯根面の間に生じた新生歯根膜c
の線維の増生程度も低かった。
- (6) 新生セメント質eも、既存のセメント質表面から
歯根面上にかけて形成されるものの、欠損窩洞中央部

(11)

に向かうにつれてその厚みは減少し、その形成程度は実施例 1 のものに比べて低かった。

(7) 内縁上皮細胞の侵入による長い接合上皮の形成、根吸収または膠着は、実施例 1、比較例 1 とともに認められなかった。

これらの結果より、比較例 1 に比べて実施例 1 の欠損が大きいにもかかわらず、配列番号 1 で示される b F G F を付した実施例 1 において、より歯周組織の再生または修復が顕著に認められることから配列番号 1 で示される b F G F は、破壊された歯周組織、すなわち歯根膜、歯槽骨およびセメント質などの再生に対して明らかに良好な促進作用を有し、歯周組織疾患治療にとって有用であることが示された。

製剤例 2

15 配列番号 1 で示される b F G F 含有フィブリンゲル剤の調製

0. 1 M リン酸緩衝液 (p H 6. 5) 中に配列番号 1 で示される b F G F 1. 7 7 m g / m l、フィブリノーゲン (ベーリングベルケ社製) 4 1. 6 m g / m l、
20 アプロチニン (ベーリングベルケ社製) 0. 4 1 m g / m l およびトロンビン (ベーリングベルケ社製) 3 3. 3 U / m l となるように加え、ゲル化物を調製した。

実施例 2 および比較例 2

b F G F の歯周組織再生促進作用

25 ビーグル犬 (n = 3) を用い、人工的歯周組織欠損形成術後の各歯周組織再生に対する配列番号 1 で示される

(12)

b F G F 含有フィブリンゲル剤の作用を病理組織学的に検討した。

実験に用いたビーグル犬はブラッシングなどを行なって健常な歯周組織の状態を維持した。ペントバルビタールナトリウム（ナカライテスク株式会社製）による全身麻酔およびキシロカイン（藤沢薬品工業株式会社製）による局所麻酔下にて下顎第4小臼歯の抜歯を行ない、1ヶ月後抜歯窩が治癒し口腔内に異常の認められない両側の下顎第3小臼歯を実験部位とした。全身麻酔および実験部位の浸潤麻酔下にて粘膜骨膜弁を剥離し骨を裸出した。第3小臼歯遠心部に3壁性の人工的骨欠損（頬舌幅3mm×近遠心幅3mm×深さ4mm）形態を作製し、さらに、露出歯根面のセメント質をチゼルなどを用いて完全に除去し象牙質を裸出した。左側（比較例2）に配列番号1で示されるb F G Fを含まないフィブリンゲル剤28.25 μ lを、右側（実施例2）に50 μ gの配列番号1で示されるb F G Fを含有するフィブリンゲル剤28.25 μ lを充填し、粘膜骨膜弁をもとの位置に戻し縫合した。手術後2および4週に屠殺し、常法に従って病理組織標本作製して光学顕微鏡にて観察した。

図3、5および7に実施例2の病理標本の光学顕微鏡観察結果を、図4および6に比較例2の病理標本の光学顕微鏡観察結果を示す。図3および4は術後2週の結果であり、図5、6および7は術後4週の結果を示す。図3～6はヘマトキシリン－エオジン染色を施し10倍の倍率で観察したものであり、図7はアザン染色を施した図5の一部を25倍の倍率まで拡大したものである。

図3に示されるように、実施例2の術後2週において

(13)

は、

- (1) 根尖側 (図 3 右側) 骨切断面から欠損窩洞内を歯冠側 (図 3 左側) に向かい、サンゴ様の著しい新生歯槽骨 a の増生が見られた。骨梁辺縁には骨芽細胞 b が並び、また破骨細胞も認められた。
- (2) 根尖側から歯冠側に向かい新生歯槽骨 a と歯根面の間に新生された歯根膜 c は毛細血管に富んでおり、線維 d の走行は根面に平行して配列していた。とくに、骨切断部に近い歯根膜はよく発達しており、歯根に面して斜走する部位も認められた。
- (3) 1 例ではあるが、新生セメント質 e が、既存セメント質表面から裸出された歯根面上に形成された像が認められた。

これに対して、図 4 に示されるように比較例 2 の術後 2 週においては、

- (4) 実施例 2 と同様に根尖側 (図 4 左側) 骨切断面から欠損窩洞内を歯冠側 (図 4 右側) に向かい新生歯槽骨 a の増生が認められるものの新生歯槽骨形成程度は低く、細い骨梁間は細胞成分に富む線維性結合組織であった。
- (5) 新生歯根膜 c の線維増生程度は低く、線維束は細いものであった。
- (6) 新生セメント質が形成された例は認められなかった。

図 5 および 7 に示されるように実施例 2 の術後 4 週においては、

- (1) 根尖側 (図 5 左側、図 7 下側) からの新生歯槽骨 a の増殖傾向は術後 2 週の増殖と比べて一層強まり、

(14)

活発なリモデリングが認められ骨欠損部の大部分を占めていた。

5 (2) 新生歯槽骨 a と歯根面の間の新生歯根膜 c はさらに成熟し、その線維 d の走行は歯根面に斜走あるいは垂直に配列しつつあり、シャープな線維化して新生セメント質 e に埋入する像がみられ、既存の歯根膜と類似する像を呈していた。

10 (3) すべての例において、新生セメント質 e が既存のセメント質表面から裸出された歯根面上に形成され、根面象牙質の吸収窩にも新生セメント質 e がほぼ一様に形成されており、術後 2 週の新生セメント質と比較すると厚みが増していた。

これに対し、図 6 に示されるように比較例 2 の術後 4 週では、

15 (4) 比較例 2 の術後 2 週の組織と比較すると新生歯槽骨のリモデリングは認められるものの、依然として欠損部を占める新生歯槽骨形成量は実施例 2 に比して軽度であった。

20 (5) 新生歯根膜 c は比較例 2 の術後 2 週のものと同程度であり、新生歯根膜 c の線維密度は低く、線維束は細いものが多かった。

(6) 新生セメント質 e も既存のセメント質表面から歯根面上にかけて形成されていたものの、その形成量の程度は実施例 2 に比べて軽度であった。

25 (7) 内縁上皮細胞の侵入による長い接合上皮 h の形成が 1 例認められた。

(8) 根吸収や膠着は、実施例 2 および比較例 2 とともに認められなかった。

(15)

表 1 に、えられた組織観察の結果を示す。病理学的所見を評価点数（分類値）で表わし、ウィルコクソン（W I L C O X O N）検定法（片側検定法）により統計学的処理を行なった。図 3 ～ 7 および表 1 から明らかなように、配列番号 1 で示される b F G F の歯周組織再生に対する促進効果は、歯槽骨再生に関しては術後 2 週から明瞭に認められ、歯根膜およびセメント質の再生に関しては術後 4 週経過でより顕著となった。

以上の結果から、b F G F は、破壊および損傷を受けた歯周組織の改善を著明に促進するという歯周組織疾患治療にとって重要な作用を有することが明らかとなった。

[以下余白]

(16)

表 1

所 見		実施例 2 (投薬群)		比較例 2 (無投薬群)	
		評 価 (点数)	平均点±標 準 偏 差	評 価 (点数)	平均点±標 準 偏 差
術 後 2 週	歯槽骨：				
	新 生	3、 2、 2	2.3 ± 0.58 *	1、 1、 1	1 ± 0
	骨密度	1、 2、 2	1.7 ± 0.58 *	0.5、 1、 1	0.8 ± 0.29
	歯根膜：				
	再 生	2、 0.5、 0.5	1 ± 0.87 *	0.5、 0.5、 0	0.3 ± 0.29
術 後 4 週	セメント質：				
	再 生	2、 0、 0	0.7 ± 1.15 *	0.5、 0、 0	0.2 ± 0.29
	歯槽骨：				
	新 生	3、 2、 3	2.7 ± 0.58 *	0.5、 2、 2	1.5 ± 0.87
	骨密度	2、 3、 3	2.7 ± 0.58 *	1、 2、 2	1.7 ± 0.58
術 後 4 週	歯根膜：				
	再 生	2、 2、 2	2 ± 0 *	0.5、 0.5、 0.5	0.5 ± 0
	セメント質：				
	再 生	2、 2、 2	2 ± 0 *	0.5、 1、 0.5	0.67 ± 0.29

* : $p < 0.05$ (対照群と比較して)

評価 (点数) : なし (0)、ごく軽度 (0.5)、軽度 (1)、中程度 (2)、顕著 (3)

(17)

実施例 3

b F G F の生体に対する安全性

本発明の活性成分の安全性を配列番号 1 で示される b F G F について検討した。単回投与毒性試験で、雌雄ラ
5 ットに対する皮下および経口投与による配列番号 1 で示
される b F G F の LD_{50} 値は、いずれも $75 \text{ mg} / \text{kg}$
以上であった。雌雄イヌに対する皮下および経皮投与に
よる配列番号 1 で示される b F G F の LD_{50} 値は、それ
10 ぞれ 5 および $3.36 \text{ mg} / \text{kg}$ 以上であった。上記の
ごとくラットおよびイヌに対して投与可能な最大量を投
与したが、雌雄ともに死亡例は 1 例も認められなかった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、b F G F を用いることにより、すぐ
れた歯周組織の再生作用を有する歯周組織疾患治療剤、
15 それを用いる歯周組織疾患の治療方法、インプラント材
定着促進剤ならびに象牙質再生治療剤を提供しうる。

すなわち、本発明により歯周炎の進行により喪失した
歯周組織すなわちセメント質、歯根膜および歯槽骨など
の組織全体の、バランスを適正に維持した状態への再生
20 治療に対する適用、さらには抜歯後および嚢胞または口
腔癌摘出後の歯周組織の修復、インプラント材の定着促
進、う蝕により欠損した象牙質の再生などに応用しうる
歯周組織疾患治療剤が提供される。さらに前記治療剤を
25 用いた副作用がなく有効性の高い歯周組織疾患の治療法
が確立される。

(18)

配 列 表

配列番号 1 :

配列の性質 :

配列の長さ : 154 アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

起源

生物名 : ホモ サピエンス (Homo sapiens)

配列

```

Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr
          20           25           30
Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val
          35           40           45
Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln
 50           55           60
Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg
 65           70           75           80
Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val
          85           90           95
Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn
          100          105          110
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg
          115          120          125
Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala
          130          135          140
Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
          145          150

```

(19)

配列番号 2 :

配列の性質 :

配列の長さ : 153 アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

起源

生物名 : ホモ サピエンス (Homo sapiens)

配列

Ala	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	1	5	10	15
Gly	Ala	Phe	Pro	Pro	Gly	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Tyr	Cys	20	25	30	
Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Val	Asp	35	40	45	
Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	Ile	Lys	Leu	Gln	Leu	Gln	Ala	50	55	60	
Glu	Glu	Arg	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Lys	Gly	Val	Cys	Ala	Asn	Arg	Tyr	65	70	75	80
Leu	Ala	Met	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Cys	Val	Thr	85	90	95	
Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	100	105	110	
Tyr	Arg	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Val	Ala	Leu	Lys	Arg	Thr	115	120	125	
Gly	Gln	Tyr	Lys	Leu	Gly	Ser	Lys	Thr	Gly	Pro	Gly	Gln	Lys	Ala	Ile	130	135	140	
Leu	Phe	Leu	Pro	Met	Ser	Ala	Lys	Ser	145	150									

(20)

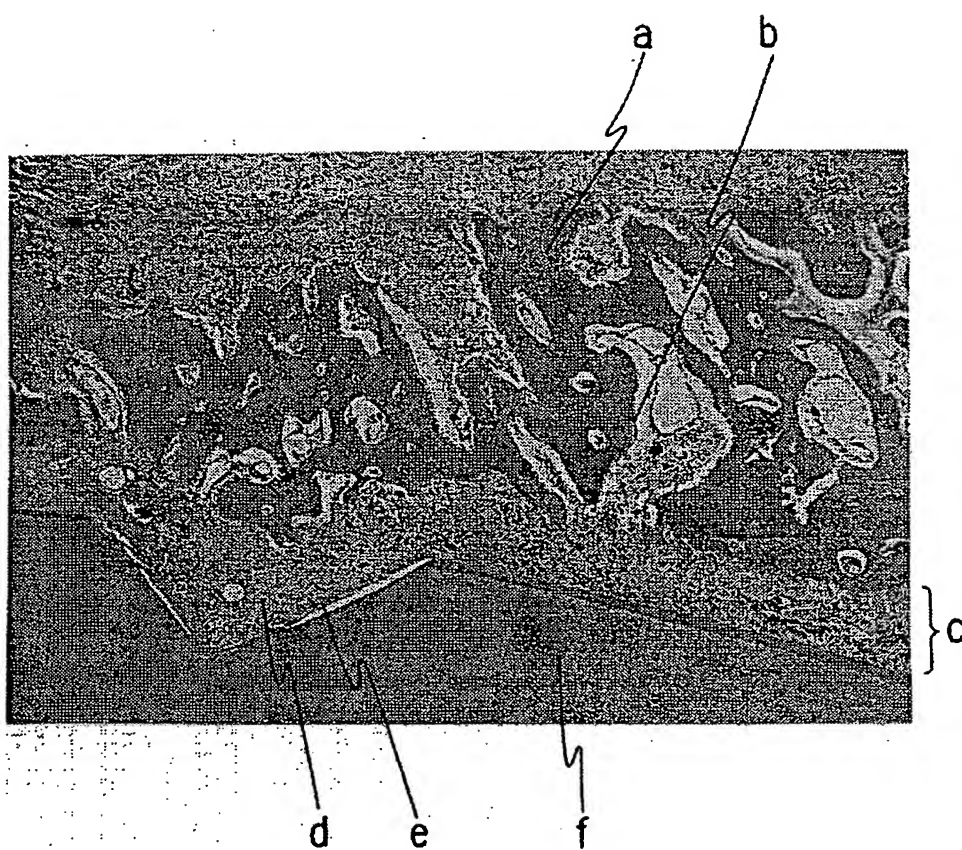
請求の範囲

1. 塩基性線維芽細胞成長因子を有効成分として含有してなる歯周組織疾患治療剤。
2. 適用される歯周組織が歯根膜、歯槽骨および／またはセメント質である請求項1記載の歯周組織疾患治療剤。
3. 適用される歯周組織が歯根膜である請求項1記載の歯周組織疾患治療剤。
4. 適用される歯周組織が歯槽骨である請求項1記載の歯周組織疾患治療剤。
5. 適用される歯周組織がセメント質である請求項1記載の歯周組織疾患治療剤。
6. 該塩基性線維芽細胞成長因子が遺伝子工学的手法で製造されたものである請求項1、2、3、4または5記載の歯周組織疾患治療剤。
7. 該塩基性線維芽細胞成長因子が配列番号1で示される154個のアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項1、2、3、4または5記載の歯周組織疾患治療剤。
8. 該塩基性線維芽細胞成長因子が配列番号2で示される153個のアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項1、2、3、4または5記載の歯周組織疾患治療剤。
9. 再生治癒を促進する請求項1、2、3、4または5記載の歯周組織疾患治療剤。
10. 新付着治癒を促進する請求項1、2、3、4または5記載の歯周組織疾患治療剤。

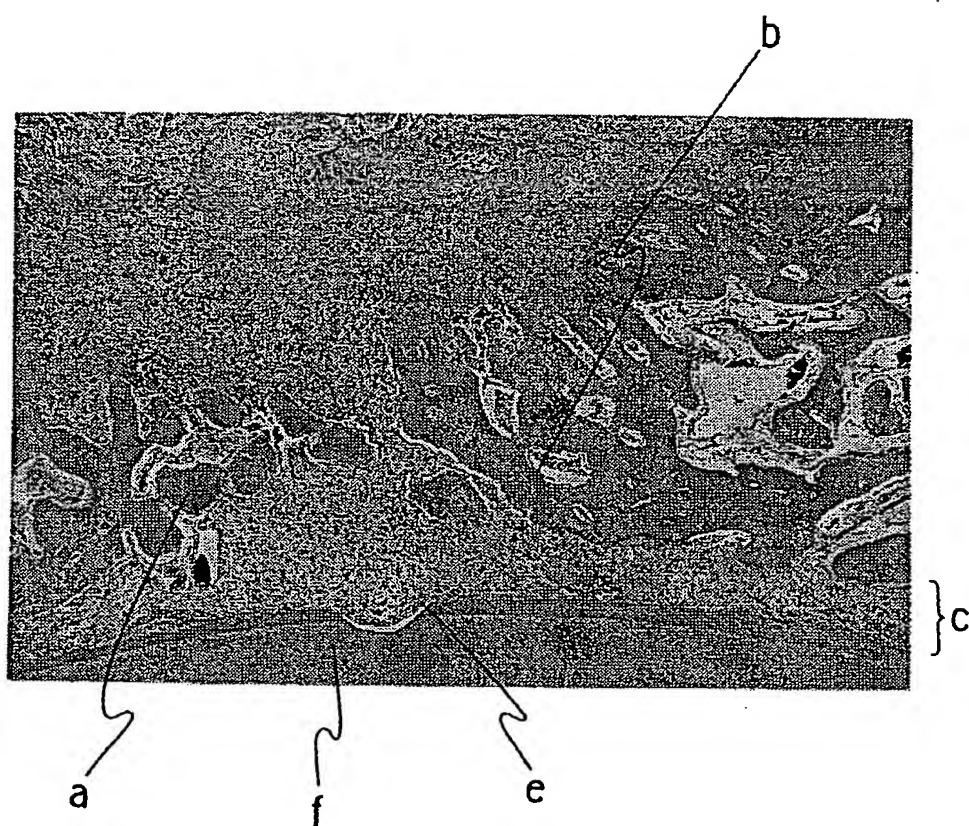
(21)

11. 該塩基性線維芽細胞成長因子を $0.1 \sim 1000 \mu\text{g}$ 含有する請求項 1、2、3、4 または 5 記載の歯周組織疾患治療剤。
12. 該塩基性線維芽細胞成長因子を $1 \sim 500 \mu\text{g}$ 含有する請求項 1、2、3、4 または 5 記載の歯周組織疾患治療剤。
13. 塩基性線維芽細胞成長因子を用いる歯周組織疾患の治療方法。
14. 再生治癒を促進する請求項 13 記載の歯周組織疾患の治療方法。
15. 新付着治癒を促進する請求項 13 記載の歯周組織疾患の治療方法。
16. 該塩基性線維芽細胞成長因子を 1 回あたり $0.1 \sim 1000 \mu\text{g}$ 、1 日 1 ～ 3 回投与する請求項 13 記載の歯周組織疾患の治療方法。
17. 該塩基性線維芽細胞成長因子を 1 回あたり $1 \sim 500 \mu\text{g}$ 、1 日 1 ～ 3 回投与する請求項 13 記載の歯周組織疾患の治療方法。
18. 塩基性線維芽細胞成長因子を有効成分として含有してなるインプラント材定着促進剤。
19. 塩基性線維芽細胞成長因子を有効成分として含有してなる象牙質再生治療剤。

F i g . 1



F i g . 2



F i g . 3

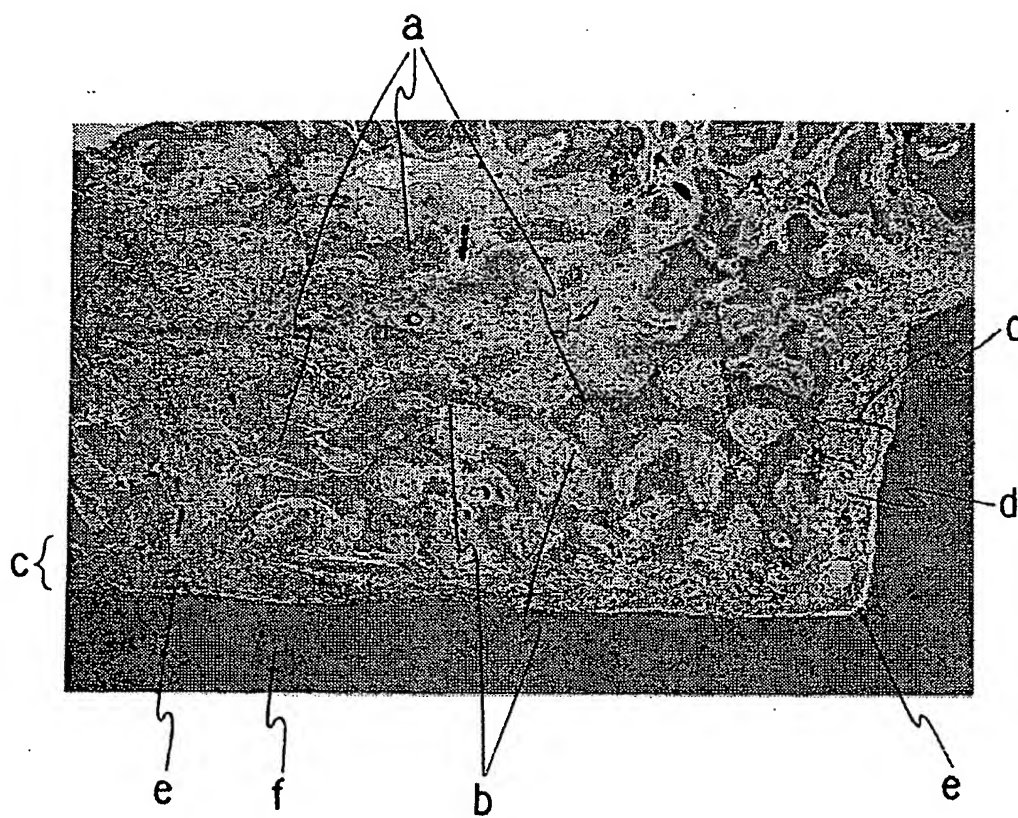
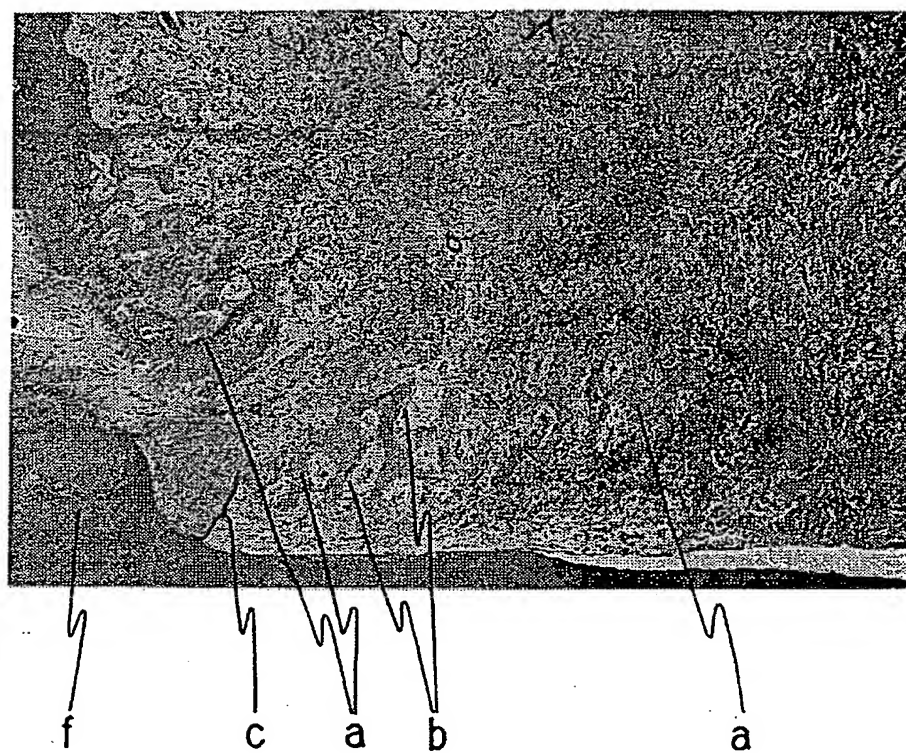
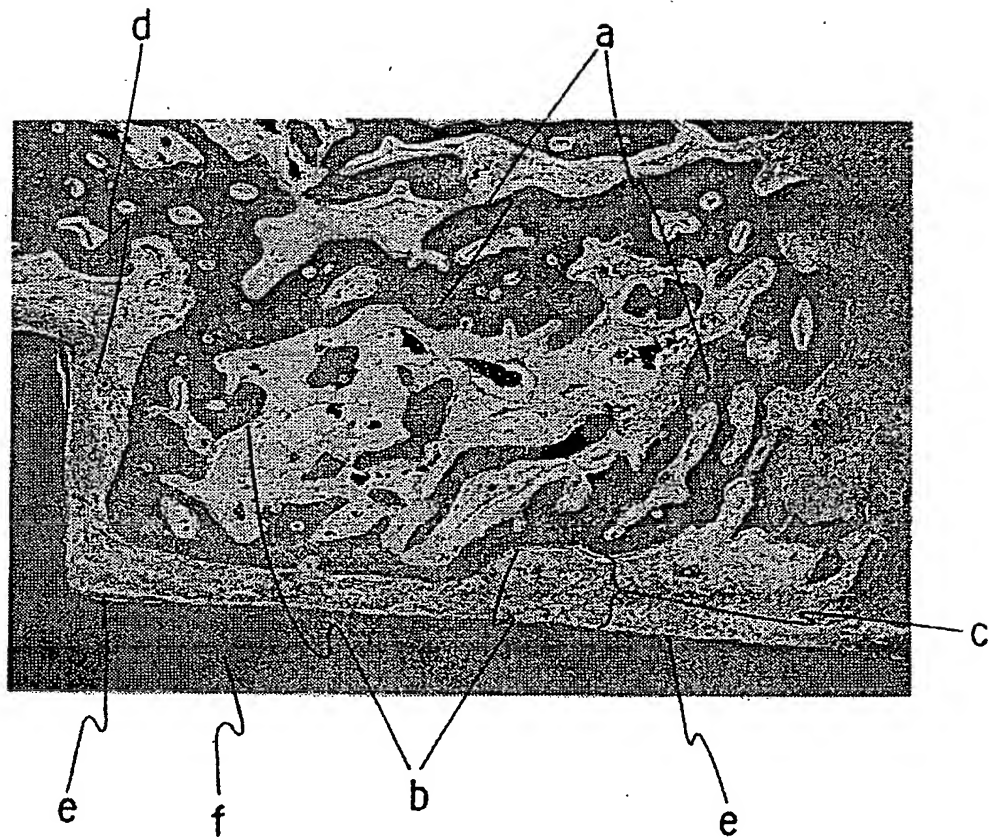


Fig. 4

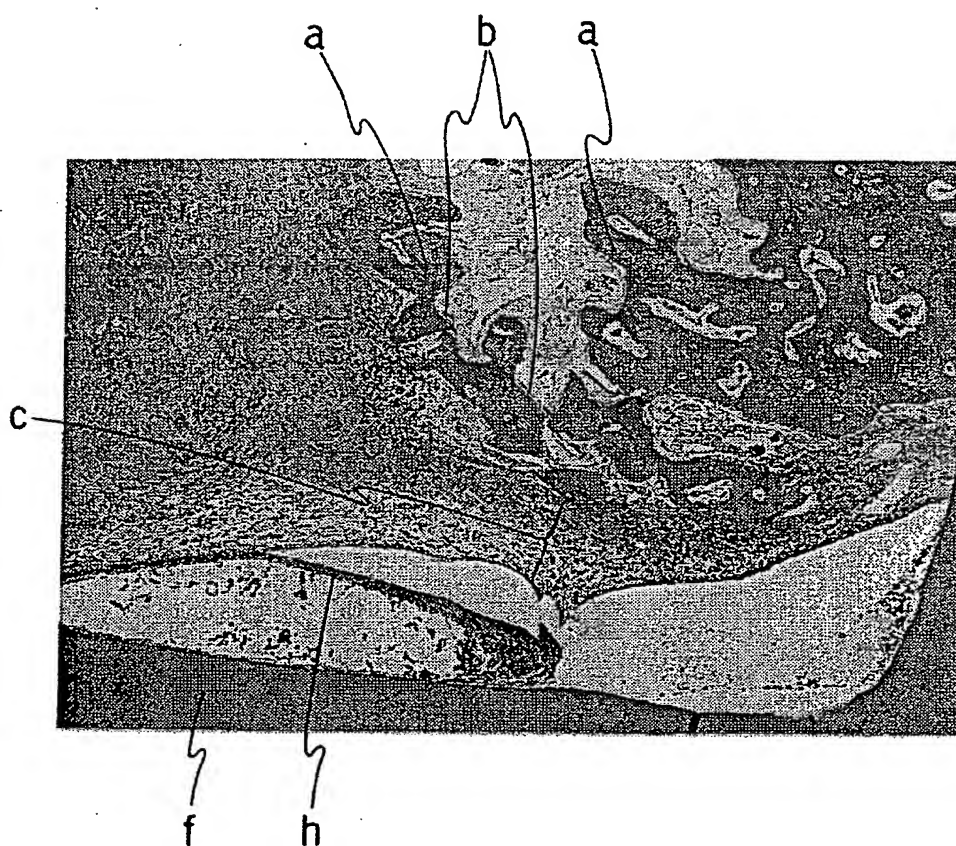


5/7

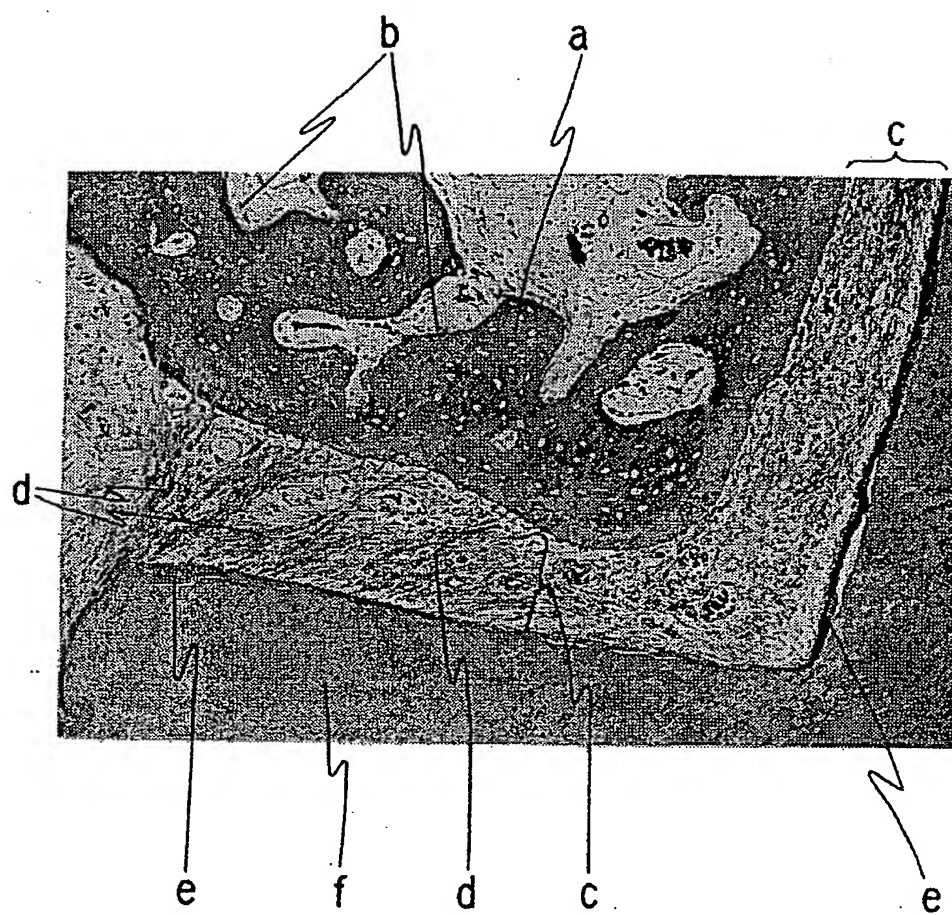
Fig. 5



F i g . 6



F i g . 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ A61K37/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ A61K37/24, 37/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 5-132426 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), May 28, 1993 (28. 05. 93), (Family: none)	1-12, 18, 19
A	JP, A, 5-124975 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), May 21, 1993 (21. 05. 93), (Family: none)	1-12, 18, 19
A	JP, A, 63-226287 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), September 20, 1988 (20. 09. 88), (Family: none)	1-12, 18, 19
A	JP, A, 63-54328 (The University of Washington), March 8, 1988 (08. 03. 88), & EP, A, 243179 & US, A, 4760131	1-12, 18, 19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 9, 1993 (09. 11. 93)

Date of mailing of the international search report

December 7, 1993 (07. 12. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP93/01211

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 to 17 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁸ A 61 K 37 / 24		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁸ A 61 K 37 / 24 , 37 / 02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 5-132426 (武田薬品工業株式会社), 28. 5月. 1993 (28. 05. 93) (ファミリーなし)	1-12, 18, 19
A	JP, A, 5-124975 (科研製薬株式会社), 21. 5月. 1993 (21. 05. 93) (ファミリーなし)	1-12, 18, 19
A	JP, A, 63-226287 (武田薬品工業株式会社), 20. 9月. 1988 (20. 09. 88) (ファミリーなし)	1-12, 18, 19
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 09. 11. 93	国際調査報告の発送日 07. 12. 93	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 松 浦 新 司	4 C 8 3 1 4
電話番号 03-3581-1101 内線		3452

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 63-54328 (ザ ユニバーシティ オブ ワシントン), 8. 3月. 1988 (08. 03. 88) & EP, A, 243179 & US, A, 4760131	1-12. 18, 19

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13-17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲13-17は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.